Aus dem Institut für Humangenetik der Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. G. G. Wendt

Disc-Elektrophorese der Serumproteine bei Huntingtonscher Chorea

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität Marburg

vorgelegt von

Johannes Georg Schindler

aus Glatz/Schlesien

Marburg 1969

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Institut für Humangenetik der Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. G. G. Wendt

Disc-Elektrophorese der Serumproteine bei Huntingtonscher Chorea

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität Marburg

vorgelegt von

Johannes Georg Schindler

aus Glatz/Schlesien

Marburg 1969

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 10. 11. 1969
gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Prof. Dr. rer.nat. P. Karlson
Referent: Doz. Dr.med. H. Oepen
Correferent: Prof.Dr.med.Dr.med.dent. H. Heuser

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	5
1. Zur Charakteristik der untersuchten Erkrankung	5
2. Biochemische Laboratoriumsbefunde	5
3. Zur Problematik des Serumeiweißbildes	6
4. Aufgabe und Fragestellung	8
B. Material und Methode	10
1. Wahl der Methodik	10
2. Untersuchungsmaterial	10
3. Herstellung der Disc-Elektrophorese-Apparatur	11
4. Chemie der PAA+-Disc-Elektrophorese	13
5. Versuchsanordnung	16
C. Auswertung der PAA-Säulen	20
1. Aufgliederung und Nomenklatur der PAA-Disc-Elektropherogramme für Humanserum	20
2. Qualitativ-densitometrisches Verfahren	21
3. Quantitativ-densitometrisches Verfahren	22
D. Ergebnisse	23
1. Qualitative Auswertung	23
2. Quantitative Auswertung	24
E. Diskussion	32
1. Material und Methode	32
2. Ergebnisse	34
F. Zusammenfassung	35
Anhang	36
Literaturverzeichnis	39

+PAA = Polyacrylamid

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534924_0055

A. Einleitung

1. Zur Charakterisierung der untersuchten Erkrankung

Die mit dem Namen des amerikanischen Arztes George Huntington (1850-1904) verbundene Chorea chronica progressiva hereditaria wird durch ein autosomal-dominantes Gen verursacht. Neuropathologisch läßt sich makroskopisch eine vor allem frontal und parietal betonte Rindenatrophie und eine Erweiterung der Seitenventrikel mit Abflachung der Stammganglientaille erkennen; im Vordergrund des mikroskopischen Bildes steht ein Schwund der kleinen Striatumzellen. Der Name der Krankheit bezieht sich auf das charakteristische klinische Syndrom, die hyperkinetisch-hypotonen Bewegungsstörungen; außerdem kommt es häufig zu Antriebs-, Affekt- und Intelligenzanomalien im Sinne einer progressiven Demenz. Das Durchschnittserkrankungsalter liegt bei etwa 44 Jahren. Zeitpunkt und Art der Manifestation variieren jedoch erheblich.

2. Biochemische Laboratoriumsbefunde

Obwohl es sich um ein dominantes Gen handelt, dessen Wirkung sich bisher vorwiegend durch morphologische Anomalien kennzeichnen ließ, wurde immer wieder versucht, biochemische Merkmale der pathogenen Anlage und des Krankheitsprozesses aufzudecken. HÜHNERFELD (1931) fand im Blut von Patienten mit Huntingtonscher Chorea einen variablen Zell-, Zucker- und Calziumgehalt und im Liquor eine Erhöhung des Calziums.[17)+)] Erhöhte Plasmawerte von K, Br, Mg, Cholesterin und erniedrigte von Ca, Cl, Glucose, aber auch erhöhte Erythrozytenwerte von Na, K und Cholesterin und erniedrigte von Mg, Ca, Br, Cl waren das Ergebnis von BIZEs (1934) Untersuchungen (1)*).[2)]

VON DER MARK (1937) fand den Erythrozytendurchmesser mit dem BOCKschen Hämocytometer vergrößert (28).[22)] K und P waren nach

---

+) Die Zahlen außerhalb der Zeilenhöhe entsprechen den Literaturangaben.

*) In Klammern auf normaler Zeilenhöhe angeführte Zahlen, die keine Jahreszahlen sind, geben die Anzahl der untersuchten Patienten an.

HERVAS (1943) im Blut (1)[16] und Cu nach NIELSEN, BUTT (1955) im Serum erhöht (2).[26] HABERLANDT (1961) berichtete über eine Erhöhung des Blut-Cholesterins.[15] OEPEN und KREUTZ (1964) konnten diese Angaben nicht bestätigen, sondern fanden wechselnde Lipoidwerte (8).[29] COURVILLE, NUSBAUM und BUTT stellten 1962 im Gehirn eine Vermehrung von Sr, Cu, Zn, Fe und Ca fest (3).[7] 1963 veröffentlichte KENYON erhöhte Werte von Ca und Mg in Erythrozyten (20).[19] OEPEN und BICKEL fanden 1964 im Urin nur bei Belastungsversuchen mit Tryptophan Fructose und Glucose erhöht (6).[28] 1965 untersuchten OEPEN und OEPEN die Konzentration von 23 Aminosäuren in Serum (13) und Liquor (3), wobei außer veränderten Val/Lys- und Phe/Tyr-Quotienten leicht erhöhte Argininwerte auffielen, während normalerweise die Aminosäuren- und Zuckerausscheidung bei der Huntingtonschen Chorea unauffällig zu sein scheint.[30] Nur gering waren auch die Veränderungen des Mg in Serum und Erythrozyten nach BRUYN, MINK und CALJE (1965) (35).[4] Nach noch unveröffentlichten Arbeiten von KREUTZ und OEPEN wurde 1965 eine Erniedrigung des erythrozytären Kaliums nach Tryptophanbelastung (4) und von TELLER und OEPEN (1966) bei der Kontrolle von Steroiden (C_{17}, C_{19}, C_{21}) im Urin eine Erniedrigung von DHEA (3) festgestellt.

3. Zur Problematik des Serumeiweißbildes

Der chronisch-atrophische Prozeß an den Ganglienzellen des Gehirns legt es nahe, nach dem Auftreten pathologischer oder veränderter Mengenverhältnisse normaler Eiweißkörper im Blutserum und Liquor cerebrospinalis zu suchen - gleich ob es sich dabei um irgendwelche Abbauprodukte oder um Substanzen handeln mag, die ursächlich an der Krankheitsentwicklung beteiligt sein könnten. Nicht nur eine durch Genwirkung zustande gekommene charakteristische Änderung des Proteinmusters, sondern schon der Nachweis unspezifischer Anomalien wäre untersuchenswert.

In der Literatur der letzten zehn Jahre sind einige derartige Befunde veröffentlicht. Dabei sah MC MENEMY (1961) die Huntingtonsche Chorea neben anderen neurologischen Erkrankungen unter immunologischen Gesichtspunkten: Er vermutete nicht nur in

Ausfall von metabolischen für die Neurone lebensnotwendigen Substanzen einen entscheidenden pathogenetischen Faktor, sondern meint, daß die zugrunde liegende Mutation möglicherweise "even stimulate the formation of antibodies".[24] VALERIE COWIE und GAMMACK (1966) bestätigten bei Patienten mit Huntingtonscher Chorea unter den Proteinfraktionen des Serums eine statistisch signifikante Erhöhung der γ-Globuline.[8] Untersuchungen MC MENEMYs (1961) ergaben außerdem erhöhte Werte für die ß-Globulin-Fraktion.[24] BRUYN und LEQUIN stellten 1964 mit Hilfe der Immunoelektrophorese unter anderem eine Erhöhung der γ_1 A-Globuline, der 7S-γ-Globuline und des α_2 Makroglobulins fest.[3] In BRUYNs Arbeit findet sich der Hinweis, daß schon in früheren Publikationen über immunoelektrophoretische Anomalien im Serum im Bereich der α_1, α_2 M, γ_1 A- und γ_1 M-Präcipitationszonen berichtet wurde.[3][38] Auf Grund dieser und der Ergebnisse von Aminosäureanalysen im Urin sah BRUYN sich veranlaßt, die Aminosäuren im Serum und Urin mittels der Hochspannungspapierelektrophorese zu überprüfen. Er kam zu dem Ergebnis, daß sich weder in quantitativer noch in qualitativer Hinsicht für irgendwelche Abnormitäten ein Anhaltspunkt ergibt. Daraus folgerte er, daß als kausaler Faktor ein enzymatischer Block im Aminosäurestoffwechsel der Patienten mit Huntingtonscher Chorea nicht in Frage kommt.[5] Nach LEONIDAS FEKAS (1959) weist das Serumpherogramm degenerativer Erkrankungen wie der Huntingtonschen Chorea "eine relative Zunahme der Gesamtheit der Globuline mit entsprechender Abnahme der Albumine auf, ohne besonderen charakteristischen Vorzug einer der Globulinfraktionen." "Im Liquorpherogramm der degenerativen Erkrankungen ist eine mäßige Zunahme der relativen Werte der ß-Globuline, mit entsprechender Abnahme der Albumine bei normalem Verhalten der übrigen Fraktionen (inklusive γ-Globuline!) festzustellen."[11] DIETRICH HABECK (1960) fand bei drei von fünfzehn Patienten mit Huntingtonscher Chorea einen "stummen γ-Typ", bei dem eine pathologische Goldsolreaktion fehlt. Diesbezüglich wird festgestellt, "daß erst die Kombination einer stärkeren Goldsolfällung mit einer deutlichen γ-Globulinvermehrung das Vorliegen eines entzündlichen Prozesses wahrscheinlich macht"[14], der bei der Chorea Huntington bekanntlich auch

histologisch fehlt. DELANKs Untersuchungen (1957) ergaben eine ß-Globulin-Vermehrung im Liquor cerebrospinalis.[10]

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß 7 S-γ-Globulin identisch mit γG-Globulin und γss-Globulin, ferner γ_1A-Globulin mit γA-Globulin und $ß_2$A-Globulin sowie γ_1-Makroglobulin mit γM-Globulin und $ß_2$M-Globulin sind.[37]

4. Aufgabe und Fragestellung

Es erscheint zweckmäßig, diese an kleinen Kollektiven gewonnenen Befunde mit Hilfe bisher nicht angewandter, qualitativ und quantitativ aussagefähiger Methoden an einem größeren Patientenkreis nachzuprüfen. Für diesen Zweck bietet sich die Disc-Elektrophorese an.

Es bleibt zu berücksichtigen, daß die quantitative Variabilität der Serumproteine relativ groß ist und dadurch nur ein sehr starkes Abweichen von der Norm eine Grundlage für Reihenuntersuchungen bieten und eventuell eine Frühdiagnose von Genträgern ermöglichen würde.

Unsere Aufgabe ergibt sich aus der Frage, ob einer der bisher beschriebenen Befunde als pathognomonisch angesehen werden kann oder ob ein weiterer bisher unbeachteter Befund die Auffassung der Huntingtonschen Chorea als einer Autoimmunkrankheit zu präzisieren vermag.

Die folgende Tabelle gewährt eine schnelle Orientierung über bisherige Befunde zum Serumeiweißbild bei Huntingtonscher Chorea.

Protein	Synonym	Veränderung	Methode	Patienten	Autoren Jahr
ß-Globuline		Vermehrung im Liquor cerebro= spinalis	Zellzählungen Eiweißreak= tionen Elektrophore= tische Auf= trennung	5 Fälle von Hirn= atrophien als Picksche u.Alz= heimersche Er= krankungen sowie Chorea Huntington	H.W.DELANK 1957
Globuline Albumine		"Relative Zunah= me der Gesamt= heit d.Globuline mit entsprechen= der Abnahme der Albumine"i.Serum	Papierelek= trophorese	74 Fälle degenera= tiver Erkrankungen d.Nervensystems, davon 3 mit Hun= tingtonscher Chorea	L.FEKAS 1959
γ-Globuline (stummer γ-Typ)		Erhöhung im Liquor cerebro= spinalis	Papierelektro= phorese+Gold= solreaktion	3 von 15	D.HABECK 1960
γ- und ß-Globuline		Erhöhung im Serum	Papierelek= trophorese	3(1)?	MC MENEMY 1961
α_1A-Glykoprotein		Erhöhung im Serum	Immunoelek= trophorese	16 von 27	G.W.BRUYN R.M.LEQUIN 1964
α_1B-Glykoprotein		Erhöhung im Serum	Immunoelek= trophorese	22 von 27	
α_2M-makroglobulin		Erhöhung im Serum	Immunoelek= trophorese	12 von 27	
γ^A	γ_1A, $ß_2$A	Erhöhung im Serum	Immunoelek= trophorese	23 von 27	
γ^G	7-S-γ, γ_{ss}	Erhöhung im Serum	Immunoelek= trophorese	16 von 27	
γ-Globuline		Erhöhung im Serum	Elektrophorese mittels Zellu= lose-Acetat- Streifen	14	VALERIE COWIE D.B.GAMMACK 1966

B. Material und Methode

1. Wahl der Methodik

Bei der Disc-Elektrophorese auf Polyacrylamidbasis nach DAVIS kommt man mit sehr geringen Substanzmengen aus. Gegenüber der Plattenelektrophorese auf gleicher Basis ist auch der Verbrauch an Reagentien sehr gering. Daraus ergibt sich eine ökonomisch günstige Voraussetzung für Reihenuntersuchungen. Sollte sich bei der Huntingtonschen Chorea oder einer anderen Erkrankung eine Anomalie der Serumproteine mit dieser Methode nachweisen lassen, wäre deshalb gleichzeitig eine günstige Basis für Familienuntersuchungen größeren Umfanges gegeben. Außerdem ließ uns die Möglichkeit, die bei der Disc-Elektrophorese gewonnenen Gelsäulen qualitativ und quantitativ photometrisch auszuwerten, ihr zunächst den Vorzug geben. Die Methodik erlaubt einen Überblick über das Auftreten abnormer Proteine und veränderter Mengenverhältnisse physiologischer Proteine im Serumproteinspektrum.

2. Untersuchungsmaterial

Bei der Arbeit standen 42 Seren von Patienten mit Huntingtonscher Chorea und 50 Kontrollseren zur Verfügung. Die Kontrollseren stammen von Personen, die sich subjektiv gesund fühlten und nicht an Huntingtonscher Chorea litten. Sie wurden im Institut für Humangenetik gewonnen. Die Seren der Patienten erhielten wir aus verschiedenen Teilen Deutschlands.

Das Alter der Kontrollpersonen schwankte zwischen 18 und 40 Jahren. Der jüngste Patient mit Huntingtonscher Chorea war 23 Jahre, der älteste 58 Jahre alt, 27 waren männlichen, 15 weiblichen Geschlechts; bei den Kontrollpersonen entsprechend 30:14. 6 Kontrollseren wurden einem "pool" von Seren entnommen, die von 60 erwachsenen Personen bei Vaterschaftsuntersuchungen gespendet worden waren.

Die Chorea-Patienten standen mit wenigen Ausnahmen unter Medikation von Reserpin, Decentan, Haloperidol, Valium, Akrinor,

Atosil etc.. Alle Seren waren vor ihrer Verwendung bei der Disc-Elektrophorese über einen Mindestzeitraum von 100 Stunden in der Tiefkühltruhe bei einer Temperatur von -15° C eingefroren.

3. Herstellung der Disc-Elektrophorese-Apparatur

Das Gerät für die Disc-Elektrophorese auf Polyacrylamid-Basis haben wir nach den Angaben von DAVIS[9)] selbst hergestellt. Dabei kamen uns die Erfahrungen GEYERs zustatten. Ein Küvettenständer diente als Träger für zwei selbstgebogene Halterungen aus Blumenkastendraht. In diese wurden zwei Pufferbehälter eingehängt, die aus Methacrylat, Polysterene oder Polyester bestehen können. Die Grundfläche der Pufferreservoire ist quadratisch (10 cm x 10 cm). Der Boden des oberen Pufferbehälters wurde mit acht Bohrungen versehen, die auf einem Radius von 2,8 cm liegen und gleichen Abstand zueinander besitzen sowie einen Durchmesser von 1,6 cm aufweisen. Je eine weitere,

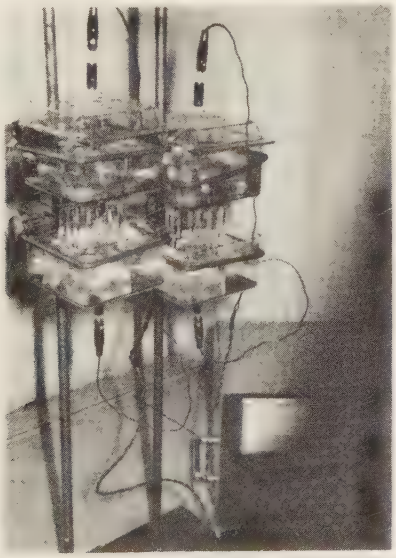


Abb. 1
Disc-Elektrophorese-Apparaturen

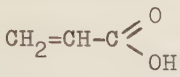
kleinere und zentrale Bohrung enthält der Deckel der oberen und der Boden der unteren Pufferkammer. Die beiden letzteren Bohrungen dienen der Aufnahme der Platinelektroden, die mit dem zahnärztlichen Prothesenkunststoff "Paladur", einem Autopolymerisat, befestigt worden sind. Zum Schutz gegen eine eventuell nachteilige Wirkung von seiten der Reagentien wurde er mit "Uhu hart" überzogen. Die Platinelektrode verläuft bis zu ihrem Austritt in einem Glasröhrchen von 0,5 cm Durchmesser. Innerhalb des Glasröhrchens ist sie mit Kupferdraht verlötet, der bis zum Kupplungsstecker verläuft. Die Elektrode, bestehend aus 0,6 mm starkem Platindraht, ragt so weit in die Kammer, daß ihr freies, nicht von Glas umgebenes Funktionsende gänzlich von Pufferlösung umspült werden kann. In die acht Bohrungen sind durchbohrte Gummistopfen eingesetzt, deren Durchmesser 0,6 cm beträgt. Diesen gegenüber finden sich im Deckel des oberen Pufferreservoirs eine gleiche Anzahl von Bohrungen mit einem Durchmesser von 1 cm. Das Entfärbegerät unterscheidet sich von der Elektrophorese-Apparatur durch eine zweite größere Bohrung (Durchmesser = 0,9 cm) vom unteren Ende bis zur Mitte der acht Gummistopfen in der Bodenplatte der oberen Pufferkammer.

Zur Inbetriebnahme der Disc-Elektrophorese-Apparatur und des Entfärbegerätes werden ferner benötigt:

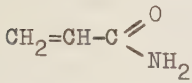
1) Acht 7 cm lange Glasröhrchen mit einem Innendurchmesser von 0,5 cm und einem Außendurchmesser von 0,7 cm
2) Acht 9 cm lange, am unteren Ende konisch sich verjüngende Entfärberöhrchen mit einem Innendurchmesser von 0,7 cm und einem Außendurchmesser von 0,9 cm
3) Acht Gummistopfen, die eine Bohrung vom schmäleren Ende bis zur Mitte aufweisen und als Ständer dienen. Die Größe der Bohrung soll so sein, daß sie die unter Punkt 1) genannten Glasröhrchen aufnehmen kann.
4) Acht Glasröhrchen von 9 cm Länge mit einem Innendurchmesser von 0,7 cm mit ballonförmigem zugeschmolzenen Ende
5) Hundert Halbmikroröhrchen einschließlich Stopfen zur Aufbewahrung der fertigen Gelsäulen.

4. Chemie der PAA-Disc-Elektrophorese

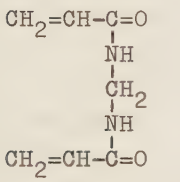
Das Acrylamid leitet sich von der Acrylsäure, einer ungesät= tigten Carbonsäure durch Substitution der Hydroxylgruppe (-OH) durch die Aminogruppe ($-NH_2$) ab. In Anwesenheit von Katalysa= toren wie Ammoniumpersulfat und Riboflavin (Vitamin B_2) be= sitzt Acrylamid bei Photopolymerisation durch eine Fluoreszenz=



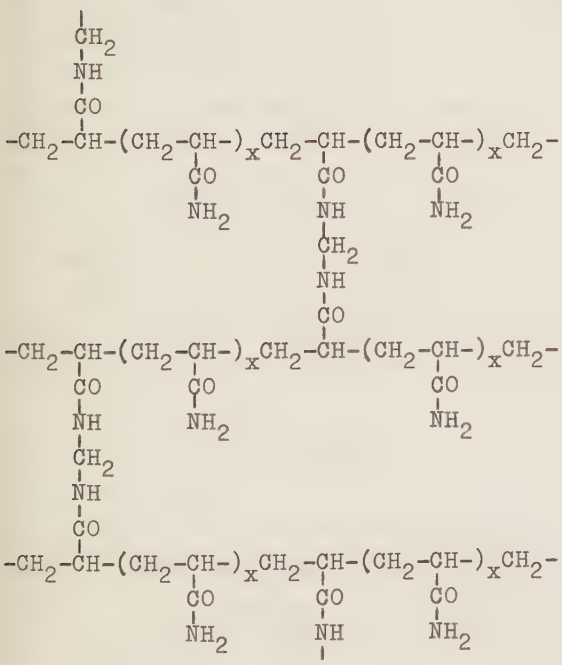
Acrylsäure[6)]



Acrylamid[36)]



N,N'-Methylenbisacrylamid[36)]



Nach Ott zit. aus Maurer[23)] "Struktur des Polyacrylamid-Gels. Monomer: Acrylamid, Komonomer (Ver= netzer): N,N'-Methylenbis= acrylamid."

lampe oder Neonröhre die Fähigkeit zur Längspolymerisation. Durch Zusatz von N,N'-Methylenbisacrylamid (Bis) wird eine zusätzliche Quervernetzung erzielt, die zur Bildung eines Gels führt, dessen Porengröße durch Konzentration und Mischungsverhältnis von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid bedingt ist.
Die Konsistenz und Transparenz des Gels sind ebenfalls vom Verhältnis beider Substanzen abhängig. Das Polyacrylamidgel ist relativ unempfindlich nicht nur gegen pH-Änderungen, sondern auch gegen Temperaturschwankungen, wie sie bei dem Entfärbevorgang im elektrischen Feld auftreten können. Es ist unlöslich und gut reproduzierbar. Eine bei der Herstellung der flüssigen Gele in den Glasröhrchen vor der Photopolymerisation vorgenommene Überschichtung mit Aqua dest. geschieht zur Verhinderung der inhibitorischen Wirkung des Luftsauerstoffes. (Gleichzeitig bewirkt der hydrostatische Druck der kleinen Wassersäule eine gerade Abschlußfläche des jeweiligen Gelabschnittes.)
Obwohl bereits 1955 SMITHIES die im Vergleich zur Papierelektrophorese differenziertere Auftrennung von Proteinen im Stärkegel der Molekularsiebwirkung zugeschrieben hat[39], sind deren Vorteile erst durch Verwendung von Polyacrylamidgelen voll genutzt worden.[36]

Die fertige Gelsäule gliedert sich in das großporige Probengel, das großporige Sammelgel und das kleinporige Trenngel. Kurz vor Eintritt in das kleinporige Trenngel erfolgt eine Konzentrierung der Serumproteine auf einer schmalen Startzone. Die im elektrischen Feld zur Anode wandernden Proteine wurden auf Grund ihrer Ladung und der Molekularsiebwirkung des Polyacrylamidgels getrennt.

Als Reagentien dienten:

1. Acrylamid
2. N,N'-Methylenbisacrylamid ("Bis")
3. 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol; auch als (Hydroxymethyl)-aminomethan ("Tris") bekannt
4. N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin ("Temed")

5. Riboflavin
6. Salzsäure (HCl), Reagenzgrad 1 (N)
7. Ammoniumpersulfat
8. Glykokoll (ammoniumfrei)
9. 7%ige Essigsäure
10. Amido-Schwarz 10B
11. Bromphenolblau

Aus diesen Reagentien werden folgende Stammlösungen, die bei Lagerung in braunen Flaschen im Eisschrank einige Monate haltbar sind, hergestellt. Eine Ausnahme bildet die Ammoniumpersulfatlösung, die nur eine Woche verwendungsfähig bleibt.

A.	1 n HCl	48,0 ml
	TRIS	36,6 g
	TEMED	0,23 ml
	H_2O auf	100,0 ml
B.	1 n HCl	48,0 ml
	TRIS	5,98 g
	TEMED	0,46 ml
	H_2O auf	100,0 ml
C.	Acrylamid	28,0 g
	BIS	0,735g
	H_2O auf	100,0 ml
D.	Acrylamid	10,0 g
	BIS	2,5 g
	H_2O auf	100,0 ml
E.	Riboflavin	4,0 mg
	H_2O auf	100,0 ml
F.	Ammoniumpersulfat	0,14 g
	H_2O auf	100,0 ml
	<u>Stammpufferlösung</u>:	
	TRIS	6,0 g
	Glykokoll	28,8 g
	H_2O auf	1000,0 ml

Aus den Stammlösungen werden vor Beginn eines Versuches die Arbeitslösungen hergestellt.

Arbeitspufferlösung:

Die Stammpufferlösung wird auf 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und mit Bromphenolblau schwach angefärbt. Die so gewonnene Arbeitspufferlösung muß einen pH-Wert von 8,3 aufweisen.

Entfärbelösung:

7%ige Essigsäure
Diese Entfärbelösung dient gleichzeitig als Aufbewahrungslösung für die Gelsäulen, die in ihr über einen sehr großen Zeitraum haltbar sind.

Fixier- und Färbemittel:

Amido-Schwarz 10 B 1 g
7%ige Essigsäure 100 ml
Bei längerer Verwendung dieser Lösung empfiehlt es sich, sie vor und nach jedem Gebrauch zu filtrieren.

Beim Umgang mit polyacrylamidhaltigen Substanzen muß beachtet werden, daß sie bei entsprechender Dosierung toxische Wirkungen auf das zentrale Nervensystem entfalten und Hautreizungen hervorrufen können.[23)]

5. Versuchsanordnung

Zunächst werden acht Gelsäulen auf Polyacrylamid-Basis hergestellt. Um einen möglichst geringen "background" (Blaufärbung nichtproteinhaltiger Gelabschnitte) zu erhalten, wird eine Zuckerlösung (125 g Haushaltszucker und 100 ml Aqua dest.) mit einem Volumen von 0,3 cm^3 in die einseitig angebohrten Ständerstopfen gefüllt. Dann folgt das Einsetzen der oben unter 1) aufgeführten Glasröhrchen in die mit Zuckerlösung gefüllten Stopfen.

Die einzelnen Gele werden kurz vor ihrem Abfüllen aus den Stammlösungen hergestellt und sind bis zu ihrer Verarbeitung

vor Lichteinwirkung zu schützen. Die Zuckerlösung wird mit 0,1 cm^3 Sammelgel überschichtet, das sich aus 1 Teil B, 2 Teilen D, 1 Teil E (s.S. 15) und 4 Teilen H_2O zusammensetzt und in flüssigem Zustand einen pH-Wert von 6,7 aufweisen soll. Das Sammelgel wird im Röhrchen mit Aqua dest. überschichtet, damit das Gel durch den hydrostatischen Druck unter der nur wenige Millimeter hohen Schichtsäule in gerader Abschlußfläche auspolymerisieren kann. Vermischung von flüssigem Gel und destilliertem Wasser ist möglichst zu vermeiden.

Zur Photopolymerisation werden die Röhrchen in einem Abstand von nur wenigen Zentimetern vor eine Neonröhre gestellt. Nach 20 Minuten Photopolymerisation wird das Aqua dest. vom erstarrten Sammelgel abgegossen und das Trenngel, pH = 8,9, (1 Teil A, 2 Teile C, 3 Teile H_2O, 4 Teile F) abgefüllt. Überschichtung mit Aqua dest. und Photopolymerisation lassen das Trenngel in 45 Minuten erhärten. Danach werden die Glasröhrchen aus dem Gummistopfen entfernt. Bei dieser Manipulation gelangt durch Abbiegen der Gummimanschette bis zum Boden des Stopfens zwischen Gel und Gummi Luft. Dadurch wird verhindert, daß durch den entstehenden Unterdruck das Sammelgel verletzt wird. Nach gründlicher Herausspülung der Zuckerlösung mit Aqua dest. aus dem über dem Sammelgel befindlichen Röhrchenabschnitt wird das Glasröhrchen umgekehrt (mit dem Trenngel nach unten) in einen neuen sauberen Ständerkorken gesteckt.

Die Probengellösung wird in einem Gefäß aus 0,4 ml Sammelgellösung und 3 µl Serum angesetzt. Von diesem als Probengel bezeichneten Gemisch werden 0,2 ml aufgetragen, mit Aqua dest. überschichtet und für 20 Minuten zur Photopolymerisation vor eine Fluoreszenzlampe gestellt. Diese Werte wurden rein empirisch ermittelt. Die Proteinkonzentration durfte pro Säule deshalb nicht höher liegen, weil sonst die photometrische Aufzeichnung durch das KOCHsche Densitometer bei einer Wellenlänge von 560 nm den linearen Bereich überschreiten würde (betr. quantitative Versuche).[20)21)] Nach Entfernung des Aqua dest. und der Glasröhrchen aus dem Ständergummistopfen wird mit Arbeitspufferlösung nachgefüllt. Die Gelröhrchen werden nun in die Gummistopfen des oberen Pufferreservoirs von unten her

eingesetzt. Die Kammern werden mit Arbeitspufferlösung gefüllt. Luftblasen, die sich ober- oder unterhalb der Gelsäule im Röhrchen gebildet haben, werden mit einer Pipette entfernt, da sie eine Behinderung für den Stromfluß darstellen würden. Die obere Elektrode wird zur Kathode, die untere zur Anode gepolt. Damit ist folgende Versuchsanordnung gegeben:

Kathodenpuffer
Probengel
Sammelgel
Trenngel
Anodenpuffer

Die Trennung der Proteine erfolgt bei 3 mA/Säule. Man kann auch eine geringere Ampèrezahl wählen. 5 mA/Säule sollte jedoch wegen der zu erwartenden Wärmeentwicklung nicht überschritten werden, da sonst die Gefahr einer Denaturierung hitzeempfindlicher Proteine gegeben ist. (Nach dem JOULEschen Gesetz ist die entwickelte Stromwärme dem Quadrat der Stromstärke direkt proportional.) Damit ergäbe sich eine Strukturänderung der Proteine mit Verlust der biologischen und Veränderungen der chemischen und physikalischen Eigenschaften.

Während die Spannung bei der Disc-Elektrophorese konstant bleibt, stellt für den folgenden Entfärbevorgang die Stromstärke die konstante Größe dar.

Nach dem Lauf der Disc-Elektrophorese sind die Glasröhrchen mit ihren Gelsäulen zwecks Diffusionshemmung sofort in Eiswasser zu bringen. Nach 10 Minuten werden die Gelsäulen aus dem Glasröhrchen durch Umspritzen mit Aqua dest. zwecks stumpfer Ablösung mit Hilfe einer Rekordspritze mit Kanüle schonend herausgelöst. Die Proteinfärbung erfolgt mit Amido-Schwarz 10 B in 7%iger Essigsäure für zwei Stunden.

Entfärbt wurde im elektrischen Feld in 2 $\frac{1}{2}$ Stunden mit 7%iger Essigsäure bei 300 Volt, wonach vorhandene Proteinbanden dunkelblau gefärbt bleiben. Die dabei verwendeten unten konisch verengten Glasröhrchen sind bei der Beschreibung der Apparatur unter Punkt 2) aufgeführt. Auch vor der Entfärbung müssen im Röhrchen alle Luftblasen entfernt werden, da sonst der Vorgang

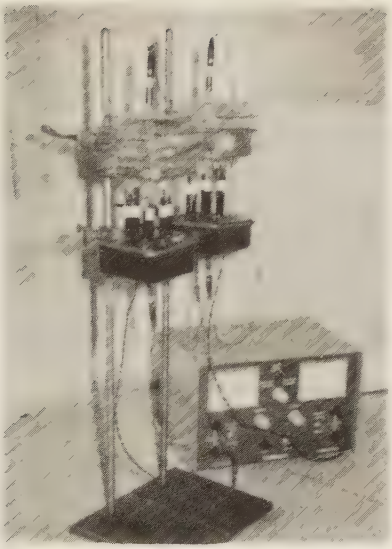


Abb. 2
Disc-Elektrophorese-Geräte während des Entfärbevorganges

behindert wird. Auftretende Gasblasen während des Entfärbevorganges führen zur Erhöhung des elektrischen Widerstandes.[23)]

Die gewonnenen Präparate lassen sich in 7%iger Essigsäure unter Verschluß in Halbmikroröhrchen über einen längeren Zeitraum aufbewahren.

Die bei der Disc-Elektrophorese und der Entfärbung angelegten Netzanschlüsse zwingen dazu, das Gerät so abzusichern, daß kein Kontakt zwischen Benutzer und Gerät während der Betriebszeit eintreten kann, da die Netzanschlüsse tödlich wirken können.[9)]

C. Auswertung der PAA-Säulen

1. Aufgliederung und Nomenklatur der PAA-Disc-Elektrophero= gramme für Humanseren

Die in dieser Arbeit gewählte Aufteilung der PAA-Disc-Elektro= pherogramme für Humanserum gründet auf der von GEYER et al.[13] aufgestellten Gliederung des Proteinspektrums und einer ver= gleichenden Durchsicht von 300 selbst angefertigten Serumphe= rogrammen (vgl. Abb. 3).

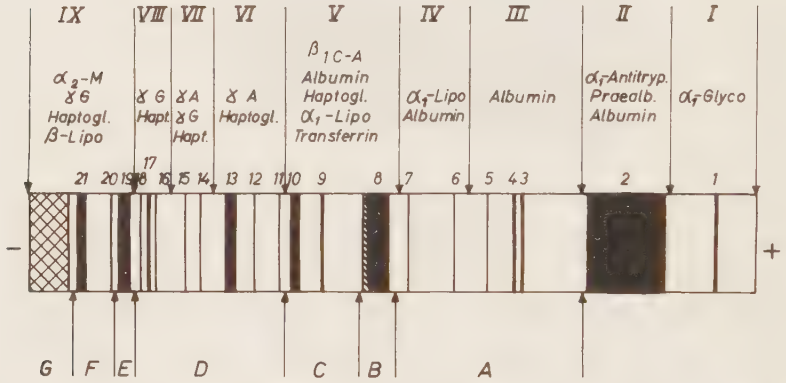



Abb. 3 (Modifiziert nach [13])

"PAA-Disc-Elektrophorese: Proteinspektrum von Human-Normalse= rum. Die Pfeile (Schnittführung) markieren die Säulenabschnit= te I-IX. Dazwischen die in den einzelnen Abschnitten nachge= wiesenen Serumproteine. Schraffiert: Sammelgel." 13) Die am unteren Rand der Abbildung erscheinenden Bereiche A-G geben die für diese Arbeit gewählte Einteilung der Gelsäulen an.

Es wurde von der Beobachtung ausgegangen, daß es markante, in jedem Elektropherogramm des menschlichen Serums genau festzu= legende Proteinbanden gibt (Abb. 3). Hierzu zählen Transferrin (Bande 8), β_{1A} (B.9), β_{1C} (B.10) und α_2-Makroglobulin (B.19). Die Bande 19 spaltet gegenüber frischem Humanserum in gealter= tem (48 Std. bei 37°C) in 19a und 19b auf.[13] Bande 21 ent= spricht dem ß-Lipoprotein.Die Bande 1 wurde bei der quantitativen

Auswertung unberücksichtigt gelassen, da das an dieser Stelle liegende α_1-saure -Glykoprotein bei der bioptischen Beurteilung keine Besonderheiten erwarten ließ. Deshalb erschien es wünschenswert, die bioptisch nicht sicher beurteilbaren großmolekularen Proteine beim Anpassen der Gelsäulen an die Küvette des KOCHschen Densitometers unter Verzicht auf Bande 1 zu erhalten. Eine quantitative Auswertung der Bande 2 mit den Proteinen α_1-Antitrypsin, Praealbumin und Albumin zeigt einen eminent hohen Wert und einen plateauartigen Verlauf des Kurvengipfels. Eine Auswertung war mit dem zur Verfügung stehenden Densitometer nicht möglich. Die Säulenabschnitte III und IV mit den Banden 3-7 wurden als Bereich A zusammengefaßt; er enthält somit Albumin und α_1 Lipoprotein. Der Bereich B entspricht dem Transferrin. Da durch den Alterungsprozeß β_{1C} in β_{1A} übergeht, wurden beide Proteine zum Bereich C zusammengefaßt. Weil die γ-Globuline die Eigenschaft besitzen, statt scharf begrenzter Banden einen diffusen Hintergrund zu bilden[1)13)43)], und Haptoglobine als wechselnde Banden erscheinen,[1)13)] ist es gerechtfertigt, 11-18 als Bereich D zusammenzufassen, der somit γA, γG und Haptoglobine enthält. Abschnitt E=19 entspricht dem α_2 Makroglobulin. Das zum Sammelgel hin gelegene Ende des Trenngels mit den Banden 20 und 21 enthält als Bereich F ebenfalls Haptoglobin, außerdem γG und ß-Lipoprotein. Der in Abbildung 3 schraffierte Abschnitt entspricht dem Bereich G und ist mitdem Sammelgel identisch. Er wurde gesondert ausgewertet. Im Gegensatz zu proteinfreien Bezirken des Trenngels zeigt er eine diffuse Erhöhung der Dichte. Der Grund hierfür ist nach DAVIS nicht in vorhandenem Protein zu suchen, sondern in "einer photographischen Reproduktion der Lichtverteilung des Sammelgels".[9)]

2. Qualitativ-densitometrisches Verfahren

Zur qualitativ-densitometrischen Auswertung wurden die Säulen entsprechend der Empfehlung von DAVIS mit ungefähr 200 µg Serumprotein beschickt. Die bioptische Beurteilung der Gelsäulen wurde durch einen qualitativen Vergleich der Elektropherogramme ergänzt (Abb. 4).

Abb. 4

PAA-Elektropherogramm eines Patientenserums (Chorea Hunting=ton). Die qualitative Auswertung zeigt einen Doppelgipfel im Transferrinbereich. Abbildung 6 zeigt die entsprechende Säule.

3. Quantitativ-densitometrisches Verfahren

Die quantitative Auswertung der fertigen Gelsäulen erfolgte mit Hilfe des von KOCH[20] entwickelten Zusatzgerätes zum Photometer PMQ II der Firma Carl Zeiss in Oberkochen. Die Nullinie der mit diesem Densitometer gewonnenen Pherogramme wurde durch die Höhe des Plateaus im proteinfreien Säulenbe=reich I (siehe Abbildung 3) festgelegt. Es wurden, wie auf S. 20 ff. beschrieben, nur die Bereiche A-G ausgewertet. Die Säulen wurden mit einer Proteinkonzentration beschickt, die es noch ermöglichte, daß die auszuwertenden Kurven im linearen Bereich blieben (Abb.5). Diese Konzentration wurde empirisch ermittelt und lag bei 80 µg Proteingehalt/Säule. Die Bereiche A-F wurden ausplanimetriert. Ihre Summe entsprach 100%. Für die Einzelbereiche wurden Relativprozente ermittelt. So konn=ten die Werte von 42 Patientenseren mit 50 Kontrollseren in jedem Bereich verglichen werden. Der Bereich G, der dem Sam=

melgel entspricht, wurde gesondert betrachtet und wie folgt berechnet:

$$x : a = b : y$$

$$x = \frac{100 \cdot b}{y}$$

a = 100%
b = Planimeterwert von G
y = Planimeterwert von a = Planimeterwert der Bereiche A-F

Abb. 5

PAA-Disc-Elektropherogramm eines Patientenserums (Chorea Huntington). Quantitative Auswertung. Abbildung 8 zeigt die entsprechende Säule.

D E r g e b n i s s e

1. Qualitative Auswertung

In einem Patientenserum wurde ein auffälliger qualitativer Befund erhoben: Im Transferrinbereich zeigten sich zwei etwa gleichstarke Banden (Abb. 6).

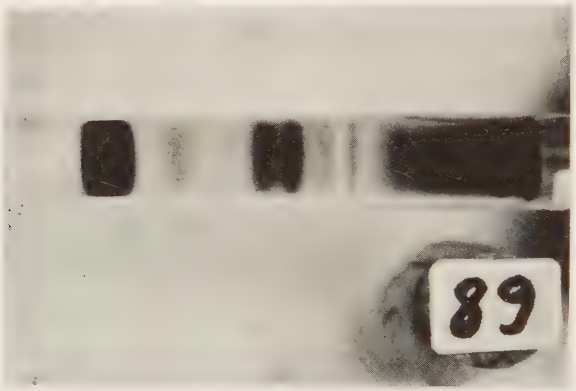


Abb. 6

Qualitative PAA-Disc-Elektrophorese eines Patientenserums (Chorea Huntington), Doppelbande im Transferrinbereich

Das zu Abbildung 6 gehörende densitometrisch gewonnene Kurvenbild zeigt Abbildung 4. Um einen Artefakt mit Sicherheit auszuschließen, wurden mehrere Läufe mit jeweils anderen Kontrollseren gestartet, wobei sich stets der gleiche Befund ergab (Abb. 7).

Durch Isotopen-Untersuchungen von Herrn Prof. Dr. CLEVE konnte festgestellt werden, daß nur eine der beiden fraglichen Banden dem Transferrin entsprach, während es sich bei der anderen um ein eisenfreies Protein handelte. Im Rahmen dieser Versuche wurde die vorrätige Serummenge aufgebraucht. Bei späteren Kontrolläufen neu entnommener Serumproben desselben Patienten konnte der Befund nicht reproduziert werden. Es zeigte sich

vielmehr stets nur eine Transferrinbande an typischer Stelle. Eine Erklärung dieses inkonstanten Befundes kann zur Zeit nicht gegeben werden.

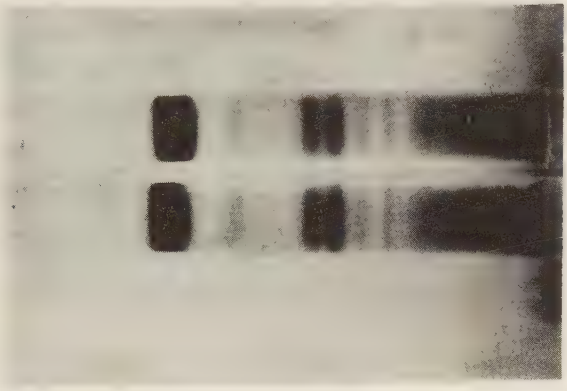


Abb. 7

Qualitative PAA-Disc-Elektrophoresen desselben Patientenserums (Chorea Huntington) wie in Abb. 6, Doppelbande im Transferrinbereich (Kontrolläufe)

Im Bereich der übrigen Säulenabschnitte ließ sich bei den Patientenseren weder ein zusätzliches Protein noch das Fehlen einer in den normalen Kontrollseren erkennbaren Proteinfraktion nachweisen.

2. Quantitative Auswertung

Abbildung 8 zeigt eine mit 80 µg Protein beladene Gelsäule. Das zugehörige Serumpherogramm ist in Abbildung 5 dargestellt. Es zeigt, daß bei dem angegebenen Proteingehalt die Gipfel der Kurve den linear auswertbaren Bereich nicht überschreiten.

In Tabelle 2 (siehe Anhang) wurden die Bereiche A-F in Relativprozenten angegeben und Bereich G nach der auf S. 23 angegebenen Formel berechnet.

Die Abbildungen 9-15 geben das Ergebnis der Untersuchung in graphischen Darstellungen wieder. Sie zeigen, daß sich die

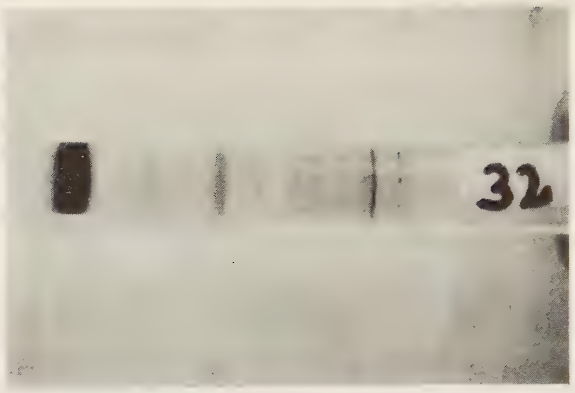


Abb. 8

Für die Densitometrie zugeschnittene Gelsäule eines Patientenserums

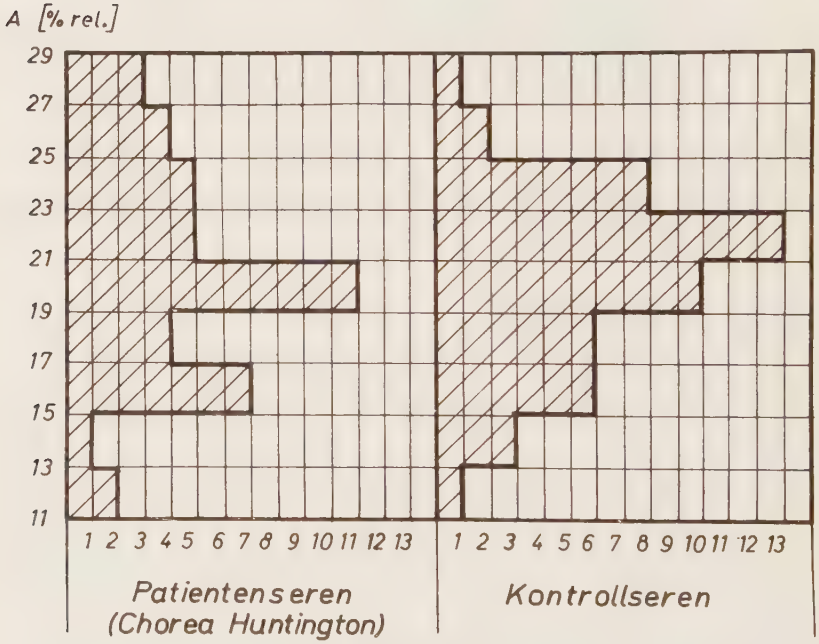


Abb. 9

Serumpherogrammbereich A: Albumin, α_1.Lipo

Häufigkeitsverteilungen der einzelnen Bereiche bei Patienten=seren und Kontrollseren im wesentlichen entsprechen. Ein dia=gnostisch verwertbarer Hinweis auf eine Chorea Huntington er=gibt sich aus den Elektropherogrammen nicht.

Gegenüberstellung in der Häufigkeitsverteilung für die Berei=che A (Abb.9), B (Abb.10), C(Abb.11), D(Abb.12), E (Abb.13), F (Abb.14) und G (Abb.15) der PAA-Disc-Elektropherogramme von Patientenseren (Chorea Huntington) und Kontrollseren.

Ordinate: Bereiche (A,B,C,D,E,F,G) in % rel.
Abszisse: Anzahl der Seren (absolut)

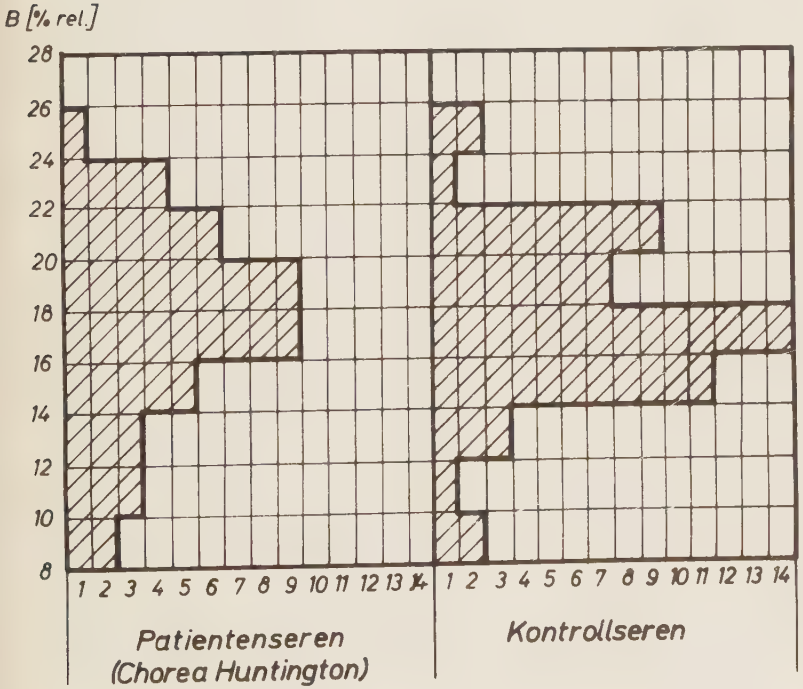


Abb. 10
Serumpherogrammbereich B: Transferrin

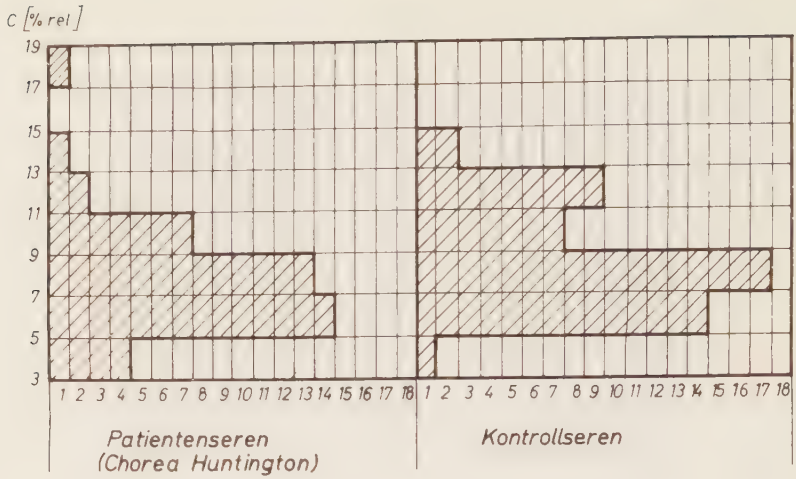


Abb. 11

Serumpherogrammbereich C: β_1A, β_1C, Albumin, Haptogl., α_1 Lipo

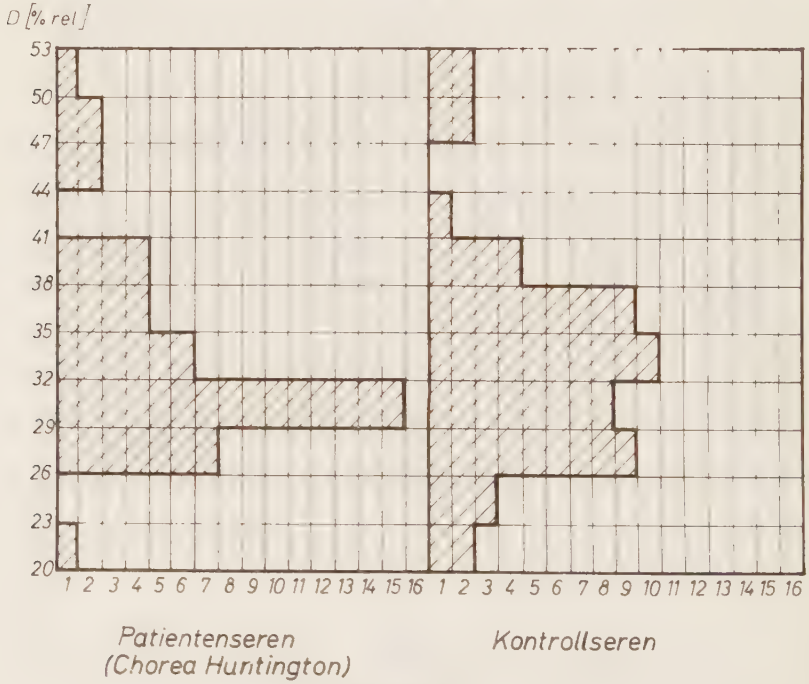


Abb. 12

Serumpherogrammbereich D: γA, γG, Haptogl.

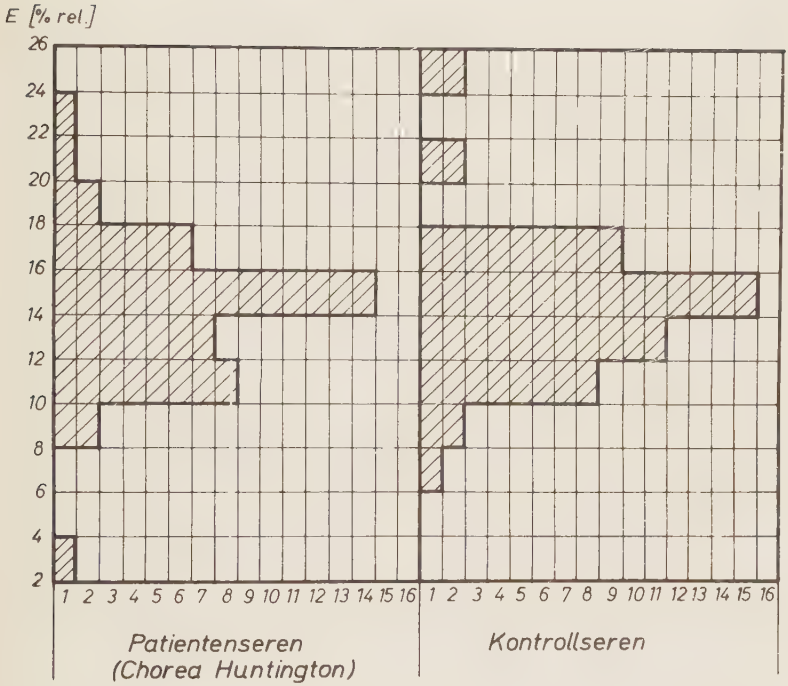


Abb. 13

Serumpherogrammbereich E: α_2-Makroglobulin

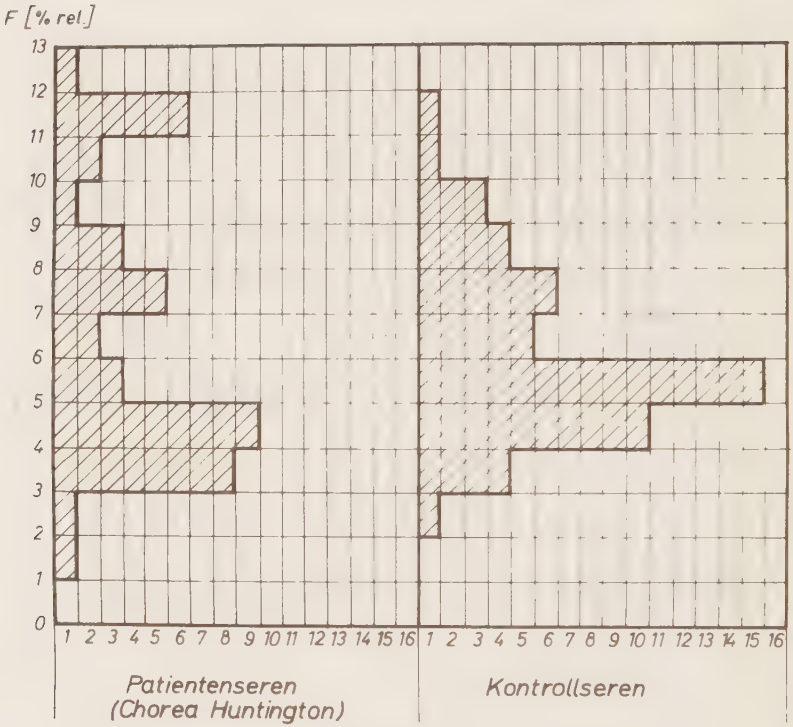


Abb. 14

Serumpherogrammbereich F: γ G, Haptogl., ß-Lipo

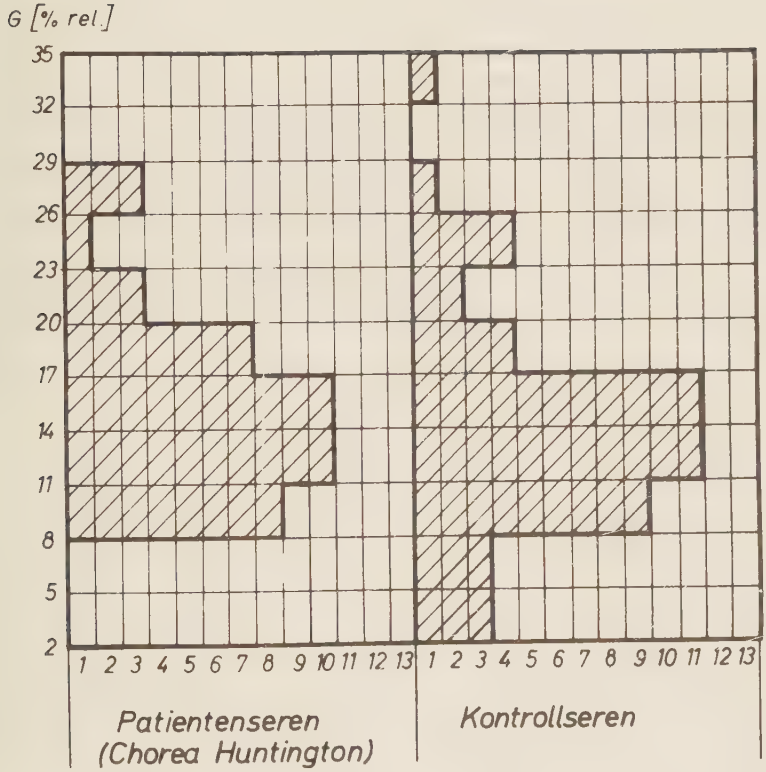


Abb. 15

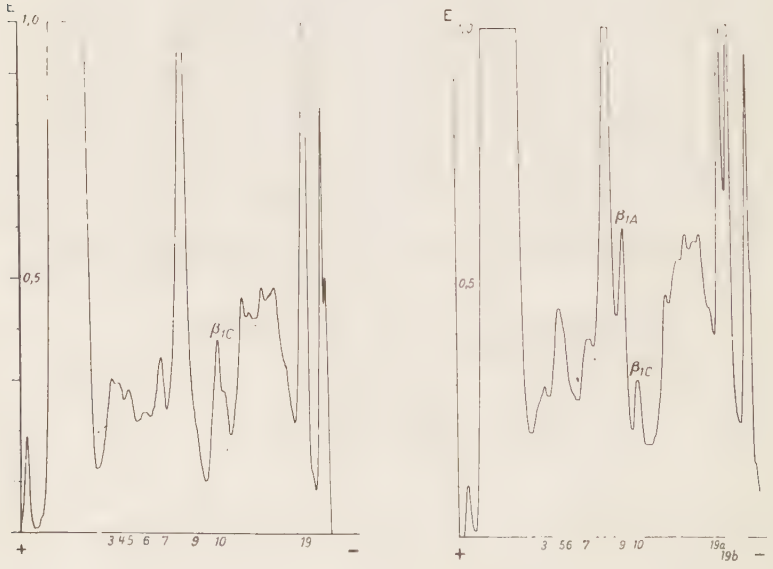
Serumpherogrammbereich G

E. Diskussion

1. Material und Methode

Da die Seren aus verschiedenen Teilen Deutschlands zugesandt wurden, war es nicht möglich, gleichaltriges Material zu untersuchen.

Frische und gealterte Seren weisen Unterschiede in ihren Elektropherogrammen auf. β_{1A}-Globulin nimmt in gealterten Seren zuungunsten von β_{1C} zu.[25] Abb.16 von GEYER et al.[13] demonstriert diesen Befund bei PAA-Disc-Elektropherogrammen. Ebenso auffällig veränderten sich bei Gegenüberstellung von frischem und gealtertem (48 Std., 37° C) Humanserum der Bereich A mit den Banden 3-7 und α_2-Makroglobulin, das durch den Alterungsprozeß in zwei Banden aufspaltete.[13] Bei der Beurteilung der



a Abb. 16[13] b

"PAA-Disc-Elektropherogramme. a Frisches Human-Normalserum; b dasselbe Serum nach 48 Std Alterung bei 37° C" 13)

hier untersuchten Seren ist zu berücksichtigen,daß die Dauer des Transportes zur Alterung des Serums geführt hat. Dem wurde durch die Einteilung in Bereiche insofern Rechnung getragen, als beispielsweise $ß_{1A}$ und $ß_{1C}$ gemeinsam im Bereich C erfaßt wurden.

Da die Choreapatienten unter Medikation (z.B. Valium, Reserpin, Akrinor, Atosil etc.) standen, war an eine pharmakologische Beeinflussung der Proteinmuster zu denken.[12] Diese Medikamente könnten die Konzentration der Aminosäuren im Serum beeinflussen.[5] Zu diesem Problem schrieben COWIE und GAMMACK 1966, daß zwar verschiedene Medikamente die Konzentration der Serumproteine erhöhen könnten, aber irgendwelche ausgeprägten Veränderungen, die den Vergleich zwischen ihren Chorea- und Kontrollpatienten beeinträchtigen könnten, kaum zu erwarten seien.[8] Eine Erhöhung der Konzentration von Serumproteinen konnte in unserem Material nicht nachgewiesen werden. Damit entfällt auch die ebengenannte Möglichkeit einer Fehldeutung.

Bei den weiblichen Personen ist die Zyklusabhängigkeit zu berücksichtigen. Schwangere und weibliche Personen, die unter dem Einfluß von Ovulationshemmern standen, wurden von der Untersuchung ausgeschlossen, da bei diesen eine Veränderung in der Eiweiß- und Aminosäurenkonzentration im Serum zu erwarten ist.[32]

Die Konzentrationen von α_2- und ß-Globulinen nehmen mit fortschreitendem Lebensalter zu.[27)34] Daraus ergibt sich eine Fehlerquelle bei der Interpretation erhöhter Werte. Eine solche Erhöhung ließ sich aber bei unserem Material nicht feststellen und braucht deshalb hier nicht diskutiert zu werden.

Die Einteilung der PAA-Elektropherogramme in Bereiche erfolgt auch deshalb, weil die γ-Globuline einen diffusen Hintergrund bilden,[1)13)43] die Haptoglobine als wechselnde Banden erscheinen[1)13] und die Albumine auf Grund ihrer Neigung zur Aggregationsbildung vielleicht für bestimmte Variationen im Proteinspektrum der Bereiche II - V verantwortlich zu machen sind.[13] Letzteres würde bedeuten, daß davon in der hier gewählten Einteilung und Auswertung die Bereiche A,B und C betroffen wären.

2. Ergebnisse

Die Häufigkeitsverteilungen der Serumproteine stimmten in den einzelnen Bereichen bei Patienten und Kontrollpersonen im wesentlichen überein. Es ergab sich keine massive und jederzeit nachweisbare Veränderung, der eine pathognomonische Bedeutung zukommen könnte.

Die Befunde von anderen Autoren über quantitative Veränderungen in der Konzentration der Serumproteine bei Chorea Huntington (vgl. S. 6 ff.) finden durch unsere Untersuchungen mit Hilfe der PAA-Disc-Elektrophorese keine Stütze.

Der inkonstante Befund einer Doppelbande im Transferrinbereich bei einem Patienten konnte bisher nicht geklärt werden.

Alles in allem läßt sich anhand unserer Ergebnisse auch die neuerdings von BURCH[44)] vorgetragene Hypothese nicht stützen. Dieser Autor glaubt nicht nur die Huntingtonsche Chorea nach Alterstypen in vier "ultimately distinctive diseases" aufgliedern zu müssen, sondern hält auch jede dieser vier Formen (zusammen mit anderen "zentralen und peripheren Neuropathien wie Multipler Sklerose, Petit mal, Grand mal und Bell's palsy") für "probably representative of a general class of spontaneous disturbed-tolerance autoimmunity". Diese Auffassung wird sich zwar mit disc-elektrophoretischen Proteinbestimmungen wohl weder beweisen noch widerlegen lassen. Sie wird durch unsere Ergebnisse zumindest nicht wahrscheinlicher.

F. Zusammenfassung

Die Aufgabe der Arbeit war es, mit Hilfe der PAA-Disc-Elektrophorese die Serumproteine bei Huntingtonscher Chorea qualitativ und quantitativ zu untersuchen. Dabei wurden 42 Patientenseren 50 Kontrollseren gegenübergestellt. Die Konzentration der einzelnen Proteine stimmte bei den untersuchten Patienten im wesentlichen mit den Kontrollseren überein. Konstante qualitative Abnormitäten des Serumproteinmusters waren nicht nachweisbar. Der einzige Befund einer Doppelbande im Transferrinbereich war inkonstant und konnte bisher nicht erklärt werden.

Die von anderen Autoren geäußerten Vermutungen über pathognomonische und phänogenetisch bedeutsame Anomalien des Proteinmusters im Serum von Patienten mit Huntingtonscher Chorea (vgl. Tab. 1) konnten mit Hilfe der PAA-Disc-Elektrophorese nicht bestätigt werden.

A n h a n g

Tabelle 2

A,B,C,D,E,F = %rel. der entsprechenden Bereiche

$$G = \frac{100 \times \text{Planimeterwert von G}}{\text{Planimeterwert der Bereiche A - F}}$$

I. Patientenseren (Chorea Huntington)

	A	B	C	D	E	F	G
Nr. 11	24,47	23,43	5,72	28,64	14,58	3,12	26,04
Nr. 12	26,31	11,57	9,26	31,78	12,42	8,63	14,10
Nr. 13	19,23	15,67	6,17	33,72	14,48	10,68	22,56
Nr. 14	21,56	18,37	8,78	31,15	11,34	8,78	15,65
Nr. 15	16,56	15,67	9,25	40,44	13,88	4,17	14,47
Nr. 16	18,21	18,01	8,70	33,40	17,61	4,04	14,17
Nr. 17	26,90	18,18	10,18	40,72	2,90	1,09	16,00
Nr. 18	24,91	22,00	6,79	31,71	11,00	3,55	13,26
Nr. 19	19,02	17,97	7,61	29,59	14,79	10,99	24,73
Nr. 20	19,28	17,97	6,20	38,56	14,05	3,92	13,72
Nr. 21	15,87	14,05	5,66	29,47	22,67	12,24	17,23
Nr. 22	18,89	16,14	5,70	31,10	20,27	7,87	15,74
Nr. 24	16,82	20,38	6,14	29,12	16,18	11,32	19,09
Nr. 25	24,03	15,72	14,83	27,89	14,83	2,67	19,28
Nr. 26	28,16	9,05	5,83	27,16	18,51	11,26	18,10
Nr. 31	21,82	18,59	7,02	29,03	12,52	11,00	14,42
Nr. 32	20,50	18,92	9,77	33,43	13,88	3,47	8,51
Nr. 34	18,05	21,19	8,32	29,35	16,95	6,12	12,71
Nr. 36	23,52	17,13	8,69	30,69	15,85	4,09	10,23
Nr. 39	19,64	16,07	4,76	37,79	10,41	11,30	13,98
Nr. 40	27,27	21,67	8,74	20,62	18,18	3,49	11,53
Nr. 41	20,99	17,49	6,41	29,44	14,57	11,07	27,40
Nr. 42	21,73	14,97	7,00	36,23	14,73	5,31	10,86
Nr. 43	22,58	16,12	9,67	33,15	11,11	7,34	15,23
Nr. 44	25,51	19,31	12,41	27,58	11,72	3,44	10,34
Nr. 45	16,45	20,69	4,98	36,15	14,21	7,48	18,70
Nr. 46	20,60	19,23	4,94	39,28	12,08	3,84	19,23

	A	B	C	D	E	F	G
Nr. 47	20,95	18,56	8,08	31,43	11,97	8,98	22,15
Nr. 60	17,03	16,48	6,04	32,96	17,85	9,61	21,15
Nr. 61	19,03	25,46	6,43	29,49	14,74	4,82	13,40
Nr. 63	21,96	20,82	5,94	28,60	16,01	6,63	15,56
Nr. 64	27,06	13,53	6,93	26,07	14,85	11,55	14,85
Nr. 65	25,69	18,89	12,95	27,60	9,55	5,30	12,10
Nr. 69	12,05	20,21	7,09	36,87	16,31	7,44	19,85
Nr. 70	19,69	22,76	7,38	31,07	15,69	3,38	13,84
Nr. 71	24,57	17,06	7,50	32,76	12,28	5,80	27,64
Nr.293	15,51	13,87	9,79	44,21	12,38	4,21	12,92
Nr.300	16,94	12,70	9,41	47,76	8,58	4,58	9,88
Nr.304	19,37	23,48	3,14	31,96	14,52	7,50	9,68
Nr.306	15,23	10,09	5,62	49,33	15,06	4,63	13,41
Nr.272	11,31	8,93	17,59	45,81	11,87	4,46	9,07
Nr.273	13,50	10,57	7,85	52,35	11,41	4,29	8,27

II. Kontrollseren

	A	B	C	D	E	F	G
Nr. 51	21,34	20,97	7,86	32,95	11,23	5,61	11,61
Nr. 52	19,69	19,39	5,45	22,72	24,24	8,48	26,66
Nr. 53	26,07	21,07	6,78	26,78	14,28	5,00	14,28
Nr. 54	19,17	17,80	8,21	30,68	16,43	7,67	33,42
Nr. 56	19,24	18,48	9,36	24,30	21,51	7,08	18,22
Nr. 57	21,95	15,85	8,53	23,57	24,39	5,69	2,84
Nr. 58	23,41	24,39	9,26	20,97	12,19	9,75	25,36
Nr. 59	18,55	25,50	8,40	23,18	16,81	7,53	15,07
Nr. 94	15,87	18,45	6,43	34,33	21,45	3,43	15,87
Nr.303	13,37	9,53	11,65	50,33	11,78	3,31	8,07
Nr.343	23,10	14,85	6,93	35,97	13,36	5,77	10,06
Nr.344	22,05	16,27	5,35	34,26	16,70	5,35	10,27
Nr.345	24,17	20,14	10,80	26,73	12,63	5,49	25,64
Nr.346	23,67	21,33	8,80	27,39	12,72	6,06	10,56
Nr.348	18,18	16,26	7,65	38,27	14,51	5,10	14,83
Nr.351	16,31	15,70	13,89	36,25	12,38	5,43	15,40
Nr.353	22,80	17,04	11,27	29,32	15,28	4,26	10,27
Nr.354	16,54	19,42	10,01	30,34	15,32	8,34	11,98

	A	B	C	D	E	F	G
Nr.355	22,29	14,80	9,05	27,70	16,02	10,10	11,32
Nr.356	18,59	22,86	11,55	27,63	14,07	5,27	12,31
Nr.357	16,61	14,91	12,64	37,21	12,78	5,82	6,81
Nr.258	14,22	12,81	10,89	51,58	7,65	2,82	4,57
Nr.259	16,10	15,62	8,13	42,74	13,71	3,66	14,51
Nr.360	18,21	19,48	11,34	28,75	15,65	6,54	13,57
Nr.261	11,94	10,22	12,16	48,43	11,84	5,38	6,67
Nr.361	23,67	17,13	11,83	29,15	14,48	3,71	14,84
Nr.262	19,62	16,45	11,39	38,19	9,98	4,34	-
Nr.362	22,22	15,30	7,28	38,25	10,56	6,37	11,83
Nr.263	13,13	9,82	12,23	48,84	11,53	4,41	8,22
Nr.363	22,69	14,32	7,37	35,46	11,34	8,79	24,82
Nr.157	21,75	17,20	7,14	33,44	15,58	4,87	16,23
Nr.158	20,25	16,39	5,78	38,26	9,96	9,32	13,18
Nr.159	24,34	20,39	7,56	32,89	10,19	4,60	15,78
Nr.171	22,60	14,49	7,12	35,38	15,47	4,91	12,03
Nr.179	23,36	15,09	13,10	28,20	15,09	5,12	15,66
Nr.184	16,36	21,03	6,23	34,02	14,02	8,31	16,36
Nr.185	22,30	20,58	5,39	27,45	16,91	7,35	19,85
Nr.186	25,00	21,00	6,00	29,50	13,50	5,00	25,50
Nr.187	23,62	17,47	7,44	32,68	11,97	6,79	20,06
Nr.188	21,40	17,20	6,75	31,00	13,80	9,85	12,09
Nr.189	28,42	13,35	7,53	27,39	16,09	7,19	20,89
Nr.190	20,06	17,39	6,68	37,12	13,71	5,01	17,72
Nr.192	21,03	17,48	4,64	37,97	13,93	4,91	17,48
Nr.197	19,94	16,57	6,74	30,33	14,88	11,51	12,07
Nr.335 pool	21,25	15,52	7,57	35,12	16,08	4,43	9,24
Nr.336 pool	19,92	18,99	6,89	30,16	16,94	7,07	12,60
Nr.337 pool	19,96	18,06	7,60	34,22	15,39	4,75	6,84
Nr.338 pool	18,32	12,70	10,61	36,97	14,79	6,59	9,80
Nr.339 pool	20,51	16,82	7,76	33,27	16,63	4,99	8,81
Nr.341 pool	18,77	21,84	6,82	32,42	15,01	5,11	3,43

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1 BIEL, H. und O. ZWISLER: Über Elektrophorese in horizontalem Polyacrylamid - Gel. 4. Mitteilung: Nachweis und Charakterisierung von Proteinen des menschlichen Serums mittels PAA-Gel-Elektrophorese und angeschlossener Immundiffusion
Behringswerk-Mitt., 46, 141-165 (1966)

2 BIZE, P.R.: Chorée de Huntington. Considérations cliniques et humorales. Du rôle éventuel d'un terrain spécial. Rev. neurol., Paris 41, 731-737 (1934)

3 BRUYN,G.W. and R.M. LEQUIN: Huntington's chorea, Lancet 1300 (1964)

4 BRUYN,G.W., C.J.K. MINK and J.F. CALJE: Biochemical studies in Huntington's chorea, Part I (Erythrocyte magnesium)
Neurology, Minneapolis, 15, 455-461 (1965)

5 BRUYN,G.W.: Biochemical studies in Huntington's Chorea, Part 3, Aminoacids in serum and urine, Psychiat.Neurol.Neurochir. 69, 139-142 (1966)

6 CHRISTEN, H.R.: Chemie, Otto Salle Verlag, Ffm - Hamburg (1968)

7 COURVILLE, C.B., R.E. NUSBAUM and E.M. BUTT: Trace metals and the brain.
Bull.Los Angeles Neurol.Soc. 27, 99-103 (1962)

8 COWIE, V. and D.B. GAMMACK: Serum Proteins in Huntington's Chorea, Brit.J.Psychiat. 112, 723-726 (1966)

9 DAVIS, B.J.: Disc-Electrophoresis - II. Method and application to human serum proteins,
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404-421 (1964)

10 DELANK, H.W.: Der Liquor cerebrospinalis bei den sogenannten Hirnatrophien,
Fortschr.Neurol.Psychiat. 25, 355-364 (1957)

11 FEKAS, L.: Das Serum- und Liquor-Eiweiß bei den degenerativen Systemerkrankungen des Nervensystems, Wien.Zeitschr.Nervenheilk., Sonderabdruck aus Band 16, Heft 1-2 (1959)

12 FAURBYE, A. and J. CLAUSEN: "Changes in serum proteins and cerebrospinal fluid proteins during pharmacotherapy of psychoses", Acta psychiat.Scand., 40, 107-116 (1964)

13 GEYER, E., S. MARGHESCU und J.J. MÜLLER: Polyacrylamid-Disc-Elektrophorese, Versuche zur Isolierung und Charakterisierung von Human-Serumpro=teinen, Klin.Wschr. 45, 717-721 (1967)

14 HABECK, D.: Die Papierelektrophorese der Eiweißkörper des Liquor cerebrospinalis, Psychiat. Neurol., Basel, 139, 185-204 (1960)

15 HABERLANDT, W.F.: Klinisch-genetische Beobachtungen bei der Huntington'schen Chorea, Ärztl. Praxis XIII 20, 1225-1228 (1961)

16 HERVÁS, C.M.: Chorea de Huntington, Rev. clin. erspan. 10, 260-265 (1943)

17 HÜHNERFELD, J.: Über den Zucker- und Kalziumspiegel, die Blutsenkung und das Hämogramm bei der Para=lysis agitans und der Chorea Hunting. Mschr. Psychiatr. (Basel) 78, 227-237 Ref. Zbl. Neurol. Berlin 62, 792 (1932)

18 KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1967)

19 KENYON, F.E. and S.M. HARDY: A biochemical study of Huntin-ton's chorea. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr. (London) 26, 123-126 (1963)

20 KOCH, P.: Disc-Elektrophorese: Ein Photometerzusatz zur Auswertung von Gelsäulen Sonderdr. aus Zeiss-Mittl. 4, 397-403 (1968)

21 KOCH, P. und S. HEINIG: Die räumliche Verteilung der Pro=teine in Feld- und Hausgrilleneiern, Wilhelm Roux' Archiv 161, 241-248 (1968)

22 MARK, F.v.d.: Untersuchungsergebnisse der Bestimmung der Erythrocyten-Durchmessergröße bei Gehirn=krankheiten mit besonderer Berücksichtigung der Chorea Huntington. Med.Welt Nr.2 (1937)

23 MAURER, H.R.: Disk-Elektrophorese. Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamidgel-Elek=trophorese, Walter de Gruyter & Co, Berlin (1968)

24 MC MENEMY, W.H.: Immunity mechanism in neurological disease. Proc.Roy.Soc.Med., 54, 127-136 (1961)

25 MÜLLER-EBERHARD, H.J., U.NILSSON and T. ARONSSON: Isolation and characterization of two β_1-glycoproteins of human serum, I. exp. Med. 111, 201-215 (1960)

26 NIELSEN, J.M. and E.M. BUTT: Treatment of Huntington's chorea with BAL. Bull. Los Angeles Neurol. Soc. 20, 38-39 (1955)

27 NÖCKER, J.: zit. bei Riva, G.

28 OEPEN, H. und H. BICKEL: Aminosäuren und Zuckerbestimmung im Urin bei Huntingtonscher Chorea, Humangenetik 1, 98-100 (1964)

29 OEPEN, H. und F.H. KREUTZ: Orientierende Untersuchung des Fettstoffwechsels bei Huntingtonscher Chorea Humangenetik 1, 101-102 (1964)

30 OEPEN, H. und I. OEPEN: Aminosäuren des Blutes bei Hunting=tonscher Chorea, Humangenetik 1, 299-302 (1965)

31 OEPEN, H.: Klinisch-genetische Untersuchung zur Phäno=genese der Huntingtonschen Chorea, Habilitationsschrift, Marburg (1966)

32 OEPEN, H., I. OEPEN und G. FUCHS: Über den Einfluß von Ovu=lationshemmern auf die Serumaminosäuren im Vergleich mit geschlechts-, zyklus- und schwan=gerschaftstypischen Befunden (im Druck)

33 PROKOP, O. und O. BUNDSCHUH, mit einem Beitrag von Dr.Hil=degard FALK: Die Technik und die Bedeutung der Haptoglobine und Gm-Gruppen in Klinik und Gerichtsmedizin, Walter de Gruyter & Co, Berlin (1963)

34 RIVA, G.: Das Serumeiweißbild. Verlag Hans Huber, Bern und Stuttgart (1960)

35 SADOWY, M.: Zuverlässigkeit und Aussagekraft von Stich=proben, Maschinenmarkt, Würzburg, 74, Nr.97 (1968)

36 SCHAIBLE, P.: Versuche zur Darstellung der Haptoglobintypen durch Acrylamidgel-Elektrophorese, Inaugural-Dissertation, Marburg (1967)

37 SCHWICK, G. und K. STÖRIKO: Laboratoriumsblätter für die medizinische Diagnostik, Behringwerke Marburg-Lahn, Mai 1964 (ergänzte Neuauflage, Juni 1965)

38 SHAWVER, J.R., T.V. FRANK and S.M. TARNOWSKI: Biochemical findings in Huntington's chorea, Amer. J. Psych., 120, 1108 (1964)

39 SMITHIES, O.: Zone Electrophoresis in Starch Gels. Group Variation in the Serum Proteins of normal human adults, Biochem. J. 61, 629 (1955)

40 STUART, H.A.: Kurzes Lehrbuch der Physik, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1966)

41 WENDT, G.G.: Erbbiologische Untersuchungen an der Huntington'schen Chorea, Wissenschaftl. Mittlg. in Klin. Wschr. 37, 1096 (1959)

42 ZWISLER, O. und H. BIEL: Über Elektrophorese in horizontalem Polyacrylamid-Gel, 3. Mitteilung: Die Kombination von Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese und Immundiffusion, Behringwerk-Mitt. 46, 129-139 (1966)

43 ZWISLER, O. und H. BIEHL: In Protides of the Biol. Fluids, p. 433, 12th Coll. Brügge 1964), ed. H. Peeters, Elsevier (1964)

44 BURCH, P.R.J.: Huntington's chorea. Age at onset in relation to aetiology and pathogenesis. Handbook of Clinical Neurology, Vol.6. P.J.Vinken and G.W.Bruyn, eds. North-Holland Publishing Company, Amsterdam. S.379-398 (Nach Abschluß der Arbeit als Sonderdruck eingegangen.) 1968

Herrn Dozent Dr. H. Oepen danke ich für die Überlassung des Themas und seine Hilfe bei der Durchführung der Untersuchungen.

Ebenso gilt mein Dank den Herren Dozent Dr. Geyer, Dozent Dr. Koch, Prof. Dr. H. Cleve, Dr. Zwisler (Behringwerke Marburg/L) und den Mitarbeiterinnen des Labors.

L e b e n s l a u f

Am 14.Mai 1942 wurde ich, Johannes Georg Schindler, in Glatz/Schlesien als erstes Kind des heute in Marburg/Lahn tätigen Zahnarztes Dr. Rudolf Schindler und seiner Ehefrau Theresia Schindler, geb. Bernhard, geboren.

1949 - 1953 besuchte ich die Volksschule in Großseelheim/Kreis Marburg a.d.L. und erhielt am 26.2.1962 das Reifezeugnis der Rabanus-Maurus-Schule in Fulda.

Mein zahnmedizinisches Studium absolvierte ich an der Philipps-Universität in Marburg/Lahn. 1965 legte ich die zahnärztliche Vorprüfung und im Juni 1968 das Staatsexamen ab.

Innerhalb meines Medizinstudiums legte ich bisher am 9.April 1969 die Naturwissenschaftliche Prüfung und am 28.März 1969 die Ärztliche Vorprüfung ab.

Am 23. Dezember 1966 heiratete ich die Lehrerin Heidelore Laser.

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:
Amon, Bommer, Braasch, Brück, Bücher, Cleve, Deicher, Delbrück, Dimroth, Dölle, Drawert, du Mesnil de Rochemont, Gedigk, Golenhofen, Graul, Grebe, Hennis, Hensel, Hering, Hildebrandt, Hohorst, Heuser, Janke, Karlson, Klingenberg, Knauff, Korb, Kühnel, Lang, Lehmann-Grube, Lübbers, Mahr, Mann, Marx, Niessing, Niemeyer, Oepen, Pantke, Peters, Petry, Pfütz, Rodeck, Rohen, Rosemann, Salfeld, Schaumlöffel, Schiff, Schimassik, Schleyer, Schmid, Schmidt, Schneider, Seidel, Sekeris, Siegert, Siess, Steib, Streicher, Strohmeyer, Vogt, Walcher, Wiegandt, Wendt, Werner, Zilliken.